



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

94088

(45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 07 1995

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

A 23J 3/00, 3/34

(21) Patentihakemus - Patentansökning	921097
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	13.03.92
(24) Alkupäivä - Löpdag	13.03.92
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	14.09.93
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utskriften publicerad	13.04.95

(71) Hakija - Sökande

1. Valio Oy, PL 390, 00101 Helsinki, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Outinen, Marko Tapani, Servin Maijan tie 1 C 20, 02150 Espoo, (FI)
2. Tossavainen Olli, Koroistentie 7 A 10, 00280 Helsinki, (FI)
3. Harju, Matti, Harjutie 6 G 2, 03100 Nummela, (FI)
4. Linko, Pekka, Otakallio 2 B 16, 02150 Espoo, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista
Förfarande för avlägsning av fenylalanin ur proteinhaltiga sammansättningar

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DD C 283256 (A 23J 3/04), DD C 147615 (A 23L 1/231), NO B 169935 (A 23J 1/20),
NO B 151442 (A 23J 3/02), US A 4293571 (A 23J 3/00), US A 4016147 (C 07G 7/00),
Chemical Abstracts, vol. 110 (1989) 227942x, Biotechnol. Bioeng. 1989, 33(10), p. 1324-1329,
FSTA 77-02-G0095, Journal of Food science, vol. 41, nro 5, 1976, p. 1029-1035,
FSTA 91-11-p0123, Journal of Food science, vol. 56, nro 4, 1991, p. 938-942,
FSTA 89-12-g0031, Agricultural and Biological Chemistry, vol. 52, nro 12, p. 2989-2994

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolloin proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan entsyymaattisesti proteolyttisellä entsyymillä proteiinihydrolysaatiksi, näin saatua proteiinihydrolysaattia käsitellään adsorptionhartsilla pylväässä, jota eluoidaan vedellä, otetaan talteen jae, josta fenyylialaniini on poistettu, tarvittaessa näin talteenotetusta jakeesta poistetaan suoloja, ja lopuksi talteenotettu jae konsentroidaan ja haluttaessa kuivataan.

Lisäksi keksinnön kohteena on näin saatu, hyvänmakuinen proteiinipitoinen koostumus, josta fenyylialaniini on poistettu joko kokonaan tai ainakin suurelta osin, sekä näin saadun proteiinipitoisen koostumuksen käyttö erikoisravintovalmisteena tai sen komponenttina fenyyliketonuriapotilaiden ravitsemuksessa.

Uppfinningen avser ett förfarande för avlägsning av fenylalanin ur proteinhaltiga kompositioner, varvid proteinet i den proteinhaltiga kompositionen spjälks enzymatiskt medelst ett proteolytiskt enzym till ett proteinhydrolysat, det sålunda erhållna proteinhydrolysatet behandlas med ett adsorptionsharts i en kolonn, vilken elueras med vatten, och en fraktion, ur vilken fenylalaninet avlägsnats, utvinns, varefter salter, ifall behövt, avlägsnas ur den utvunna fraktionen och den utvunna fraktionen koncentreras slutligen och torikas, ifall önskvärt.

Uppfinningen avser dessutom en på detta sätt erhållen, valsmakande, proteinhaltig komposition, ur vilken fenylalaninet avlägsnats antingen helt och hållet eller till största delen, samt användningen av den på detta sätt erhållna proteinhaltiga kompositionen som ett speciellt näringspreparat eller som komponent vid näringen av fenylketonuripatienter.



Menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista

5 Keksinnön kohteena on menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolloin saadaan hyvemmänmakuisia, ainakin lähes fenyylialaniinittomia proteiinihydrolysaattikoostumuksia.

10 Saatu proteiinipitoinen koostumus, josta fenyylialaniini on poistettu joko kokonaan tai ainakin suurelta osin, sopii käytettäväksi erikoisravintovalmisteena tai sen komponenttina, erityisesti fenyyliketonuriaa (PKU) sairastavien potilaiden ruokavaliossa.

15 Proteiinilähteen valinnalla ei voida vähentää fenyylialaniinin saantia ravinnosta, koska fenyylialaniinia on kaikissa eläin- ja kasviproteiineissa noin 4-6 %. PKU-potilaan onkin syytä välttää runsaasti proteiinia sisältäviä ruoka-aineita kuten kananmunaa, kalaa, lihaa ja juustoa. Muiden välttämättömien aminohappojen tarpeen tyydyttämiseksi potilaan tulisikin käyttää kliinisiä proteiini-

20 valmisteita, joista fenyylialaniini on joko kokonaan tai osittain poistettu.

25 Fenyyliketonuria on synnynnäinen sairaus, joka hoitamattomana aiheuttaa jo muutaman viikon kuluttua syntymästä vakavia aivovaurioita ja usein myös kuoleman. Potilaalta puuttuu kyky tuottaa fenyylialaniinihydroksylaasia (EC 1. 14.16.1), joka muuttaa ravinnosta saatavan aminohapon, fenyylialaniinin tyrosiiniksi. Fenyylialaniinin ja sen pyruvaatti-, laktaatti- ja asetaattijohdannaisien kertyminen vereen ja selkäydinnesteeseen aiheuttaa pakkoliikkeitä, anemiaa, ihon karhenemista ja lopulta aivovaurioita.

30 Taudin voi todeta myös potilaan virtsan kohonneesta fenyyliasetyyliglutaminiinipitoisuudesta, mistä tauti onkin saanut nimensä.

Yhdysvalloissa sekä suuressa osassa Eurooppaa yksi vastasyntynyt 11 000 - 15 000:sta sairastaa fenyyliketonuriaa. Irlannissa tauti on yleisempi, siellä yksi lapsi 4500:sta on PKU-potilas. Suomessa fenyyliketonuria on erittäin harvinainen eikä vastasyntyneiden taipumusta fenyyliketonuriaan tutkita. Maissa, joissa PKU:aa esiintyy, jokainen lapsi testataan 1-2 viikon kuluessa syntymästä seuraamalla veren fenyylialaniinipitoisuutta. Jos fenyylialaniinin määrä veressä kohoaa jatkuvasti, taudin hoitaminen on syytä aloittaa viimeistään kolmen viikon kuluttua syntymästä.

Tarkasti valvottu dieetti on toistaiseksi ainoa käytännöllinen hoitokeino. Kun ravinnosta saatavan fenyylialaniinin määrä pystytään pitämään tietyissä rajoissa, potilaan veren fenyylialaniinipitoisuus pysyy sallituissa rajoissa (20-40 mg/l). Fenyylialaniinin sietokyky kasvaa iän myötä, ja dieetti on yleensä voitu lopettaa noin 8 vuoden iässä. Uusimpien tutkimustulosten mukaan dieettiä pitäisi kuitenkin jatkaa pidempään, mikä asettaa entistä suurempia vaatimuksia erikoisravintovalmisteen maulle.

Taudin hoitoon valmistetaan aminohapposeoksia, joista puuttuu fenyylialaniini. Tällaisesta "PKU-proteiinista" tehdään vastasyntyneille maitoa lisäämällä proteiiniin tarvittavat muut komponentit, kuten rasva, vesi, laktoosi yms.. PKU-proteiinista voidaan tehdä myös muita valmiita PKU-valmisteita korvaamalla elintarvikkeen valmistuksessa käytettävä proteiini fenyylialaniinittomalla aminohapposeoksella.

Tällainen kaupallinen valmiste on esimerkiksi PK AID III -niminen tuote (valmistaja Scientific Hospital Supplies, Englanti). Tällaiset oleellisesti vain vapaista aminohapoista koostuvat valmisteet maistuvat kitkeriltä ja ne saattavat aiheuttaa osmoottista ripulia. Lisäksi vapaat aminohapot imeytyvät elimistöön huonommin kuin esimerkiksi di- ja tripeptidit.

Joitakin menetelmiä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiineista tai proteiinipitoisista koostumuksista jo tunnetaan. Vanhimmassa näistä tunnetuista menetelmistä proteiini ensin pilkotaan vapaiksi aminohapoiksi happohydrolyysillä, minkä jälkeen fenyylialaniini poistetaan seok-
5 sesta aktiivihieillellä (ks. esim. DD-patenttijulkaisu 283 256). Tämän tunnetun prosessin heikkoutena on kuitenkin huono saanto, sillä yleensä vain korkeintaan 50 % aminohapoista saadaan talteen loppujen aminohappojen adsorboituessa aktiivihieileen. Usein myös muut hydrofobiset
10 aminohapot adsorboituvat lähes kokonaan aktiivihieileen, jolloin niitä on lisättävä jälkeensä tuotteeseen. Adsorbenttina käytettyä aktiivihieiltä ei myöskään kyetä regeneroimaan, joten menetelmä on erittäin kallis.

15 Fenyylialaniini on saatu poistetuksi proteiinin happohydrolysaatista myös vahvaa anioninvaihtohartsia käyttäen (US-patenttijulkaisu 4 384 136 ja GB-patenttijulkaisu 2 103 221 A). Anioninvaihtohartsi ei kuitenkaan sovellu hyvin teolliseen tuotantoon, koska sen käyttö vaatii
20 puskuriliuosten käyttöä.

Lopez-Bajoneron et al. esittivät julkaisussa J. Food Sci., 56(4) (1991) 938-942 menetelmän, jossa fenyylialaniinia poistettiin proteiinipitoisista koostumuksista. Tällöin rasvatonta maitojauhetta tai kaseinaattia hydrolysoitiin ensin *Aspergillus oryzae*-kannan tuottamalla proteaasilla ja sen jälkeen papaiinilla. Hydrolysaattia käsiteltiin proteiiniin nähden kolminkertaisella määrällä aktiivihieiltä, jolloin 92 % fenyylialaninista poistui 50 %
25 proteiininisaannolla.

30 Mockenberg et al. puolestaan esittivät julkaisussa Research in Food Science and Nutrition, 3 (1983) 3-4 menetelmän, jossa happohydrolyysi korvattiin kaksivaiheisella subtilisiini-Pronase -entsyymihydrolyysillä, jonka tarkoituksena oli vapauttaa C-terminaaliset aromaattiset aminohapot vapaiksi aminohapoiksi. Fenyylialaniini poistui kui-
35

tenkin kokonaan vasta 425 % aktiivihiilimäärällä, jolloin myös proteiinityydestä hävisi 50 %.

5 Japanissa ryhdyttiin 1970-luvun alussa tutkimaan mahdollisuuksia tuottaa PKU-proteiinia entsymaattisin menetelmin. Tavoitteena oli parantaa makua sekä tehdä tuotteesta "proteiinimaisempaa". Useita toimivia prosesseja onkin kehitetty laboratoriomittakaavassa [ks. Yamashita et al., J. Food Sci., 41 (1976) 1029-1032; Fujimaki et al., US-patenttijulkaisu 4 016 147; Mowlah et al. Raportti, 10 Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Japani (1985) 29-39; Arai et al., Agric. Biol. Chem., 50 (1986) 2929-2931; Owada et al., Advances in Neonatal Screening, Elsevier Science Publishers B.V., 1987, s. 205-208; Maeda et al., Agric. Biol. Chem., 51 (1987) 1501-1507]. Prosessien haittapuolia ovat kuitenkin kalliit erikoisentsyymit sekä geelisuodatuksen soveltumattomuus 15 tuotantomittakaavaan.

Em. menetelmiin sisältyvässä kaksivaiheisessa prosessissa käytetään ensin pepsiiniä, joka pilkkoo raaka-aineena käytetyn heraproteiinin spesifisesti niin, että 20 fenyylialaniini jää peptidin karboksyylipeptidään. Fenyylialaniini vapautetaan edelleen vapaaksi aminohapoksi karboksipeptidaasilla tai kaupallisella entsyymivalmisteella, joka sisältää karboksipeptidaasiaktiivisuutta (esim. subtilisiini, Pronase). 25

Em. menetelmiin sisältyvässä yksivaiheisessa proteiinin hydrolyysissä puolestaan käytetään entsyymiä, joka sisältää sekä endo- että eksopeptidaasiaktiivisuuksia. Fenyylialaniini erotetaan seoksesta geelikromatografialla.

30 Tunnetut menetelmät fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista eivät toistaiseksi ole olleet tyydyttäviä teollista tuotantoa ajatellen. On siten jatkuvasti tarve teollisessa mitassa toimivasta, taloudellisesti aikaisempaa edullisemmasta ja tehokkaammasta menetelmästä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiineista tai 35

:

proteiinipitoisista koostumuksista, jolla menetelmällä saataisiin myös aikaisempaa paremman makuista, oleellisesti fenyylialaniinitöntä proteiinituotetta.

5 Nyt on yllättäen keksitty tapa, jolla yllä esitetyt ongelmat voidaan välttää ja samalla saadaan hyvällä saannolla fysiologisesti hyvälaatuista ja erinomaisen makuista PKU-proteiinihydrolysaattia.

10 Keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan oleellisesti fenyylialaniinitöntä proteiinikoostumusta, joka sisältää runsaasti ravitsemuksellisesti arvokkaita di- ja tripeptidejä ja vain noin 25 paino-% vapaita aminohappoja. Tämä tuote on maultaan erinomainen eikä se maistu kitkerältä. Lisäksi se liukenee hyvin lämpimään veteen.

15 Lisäksi keksinnön mukainen menetelmä soveltuu hyvin teolliseen tuotantoon ja se koostuu yksinkertaisista yksikköprosesseista. Menetelmä on varsinaisesti kaksi-vaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa proteiinipitoinen koostumus hydrolysoidaan entsymaattisesti ja toisessa vaiheessa näin saatua proteiinihydrolysaattia käsitellään adsorptio-
20 hartsilla. Lisäksi tässä menetelmässä käytetty adsorptiohartsi voidaan regeneroida yksinkertaisesti elintarviketeollisuudessa yleisesti käytettävällä lipeällä, jolloin hartsi on heti valmis uudelleenkäytettäväksi. Hartsin adsorptiokyvyssä ei ole todettu heikentymistä useiden kymmenien hydrolysaattipanoksen regenerointisykliä jälkeen.
.. 25 ..

Keksinnön kohteena on siten menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että

30 a) proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan entsymaattisesti proteolyyttisellä entsyymillä proteiinihydrolysaatiksi, jonka hydrolysoitumisaste on noin 30 - 60 %,

b) näin saatu proteiinihydrolysaatti ultrasuodataan ja permeaatti otetaan talteen,

35 c) haluttaessa liuoksen pH:ta säädetään alueella 2 - 10 suolahapolla tai lipeällä,

d) näin saatu proteiinihydrolysaatti johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h lämpötilassa 5 - 65 °C,

5 e) pylvästä eluoidaan vedellä lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h,

f) otetaan talteen jae, josta fenyylialaniini on poistettu,

g) tarvittaessa talteenotetusta jakeesta poistetaan suoloja, ja

10 h) lopuksi talteenotettu jae konsentroidaan kuiva-ainepitoisuuteen 70 - 80 paino-% ja haluttaessa kuivataan.

Kaikissa eläin- ja kasviproteiineissa on todettu olevan noin 4 - 6 paino-% fenyylialaniinia proteiinin kokonaismäärästä laskettuna.

15 Prosessin ensimmäisessä vaiheessa proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan entsyymaattisesti proteolyyttisellä entsyymillä siten, että hydrolysoitumisaste on n. 30 - 60 %.

20 Käsiteltävä proteiinipitoinen koostumus voi olla mikä tahansa muitakin välttämättömiä aminohappoja kuin fenyylialaniinia sisältävä proteiinipitoinen koostumus, esimerkiksi heraproteiini tai soija-proteiinikonsentraatti. Heraproteiinissa proteiinipitoisuus voi vaihdella välillä 35 - 85 paino-%. Soija-proteiinikonsentraatin tyypillinen
25 proteiinipitoisuus on noin 52 paino-%.

Lähtöaineen proteiinipitoisuus vaikuttaa tuotteen proteiinipitoisuuteen. Koska on suotavaa, että tuote sisältää mahdollisimman paljon proteiinia, lähtöaineen proteiinipitoisuuden tulisi olla mahdollisimman korkea, suotavimmin yli 70 paino-%.

30 Proteolyyttisenä entsyyminä käytetään edullisesti pankreatiinia, jonka sopiva käyttömäärä on noin 3 paino-% proteiinin määrästä laskettuna.

Entsyymaattisessa käsittelyssä fenyylialaniini vapautuu vapaiksi aminohapoiksi noin 70 - 90-%:isesti. Saa-

dun proteiinihydrolysaatin proteiinista n. 3,6 - 3,8 % on fenyylialaniinia.

5 Entsymaattisen hydrolyysin jälkeen proteiinihydrolysaatti ultrasuodatetaan pilkkoutumattoman proteiinin ja suurimolekyylisten peptidien poistamiseksi ja permeaatti otetaan talteen.

10 Talteenotettu permeaatti konsentroidaan haihduttamalla kuiva-ainepitoisuuteen 20 - 60 paino-%. Näin saatu konsentraatti voidaan johtaa suoraan jatkokäsittelyyn tai sitä voidaan säilöä +5 °C:ssa ennen jatkokäsittelyä. Kuiva-ainepitoisuuden 20 - 60 paino-% omaava konsentraatti voidaan haluttaessa myös kuivata esimerkiksi sumutuskui-

15 vaimella ennen jatkokäsittelyä. Ennen adsorptiohartsikäsittelyä proteiinihydrolysaattikonsentraatti tai -jauhe liuotetaan kuumaan veteen siten, että liuoksen kuiva-ainepitoisuudeksi tulee 20 - 30 paino-%.

20 Adsorptiohartsikäsittely voidaan suorittaa liuoksen pH:n ollessa 2 - 10, mutta edullisinta on käsitellä hart-silla neutraalia liuosta, jonka pH on 6,5 - 7,0. Tällöin ei tarvita pH-säätöä hydrolyysivaiheen jälkeen. Haluttaessa liuoksen pH:ta voidaan kuitenkin säätää elintarvikelaa-tuisella suolahapolla (HCl) tai lipeällä (NaOH).

25 Prosessin toisessa vaiheessa proteiinihydrolysaatti johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h. Adsorboitumisprosessi vaatii tietyn minimireaktioajan, jonka kokeellisesti on määritetty olevan riittävä, kun lineaarivirtaus ei ole suurempi kuin 1,3 m/h. Adsorptio paranee hieman tätä alem-

30 pia lineaarivirtausnopeuksia käytettäessä, mutta prosessiin kuluva aika vastaavasti pitenee, mikä nostaa kustannuksia.

35 Adsorptiohartsina käytetään edullisesti hydrofobista polystyreenirunkoista hartsia. Sopivia hartseja ovat mm. Amberlite XAD 4 ja Amberlite XAD 16, joita valmistaa Rohm & Haas (Ranska).

Hartsikäsittely voidaan yleensä suorittaa lämpötilassa 5 - 65 °C. Fenyylialaniini ja sitä sisältävät peptidit nimittäin adsorboituvat hartsiin pH:n ollessa 2 - 10 ja lämpötilan ollessa 5 - 65 °C. Edullisin hartsikäsittelylämpötila on noin 30 °C, jolloin liuoksen jäähtytykseen tai lämmitykseen ei tarvitse käyttää lisäenergiaa.

Näin käsiteltyä hartsilla täytettyä pylvästä eluoidaan vedellä samalla virtausnopeudella, jolla proteiinihydrolysaattia edellä johdettiin ko. pylvääseen. PKU-proteiini eluoituu pylvästä ennen fenyylialaniinia ja fenyylialaniinia sisältäviä peptidejä siten, että lähes fenyylialaniiniton jae saadaan eristetyksi. Kuvassa 1 on esitetty graafisesti fenyylialaniinin ja fenyylialaniinia sisältävien peptidien erottuminen proteiinihydrolysaatista adsorptiohartsipylvään avulla.

Tarvittaessa talteenotetusta, lähes fenyylialaniinittömästä jakeesta poistetaan suoloja, kuten ylimääräistä kloridia tai natriumia esimerkiksi elektrodialyysillä.

Lopuksi lähes fenyylialaniinitön tuotejake konsentroidaan kuiva-ainepitoisuuteen 70 - 80 paino-%. Tuotejake voidaan haluttaessa kuivata jauheeksi kylmä- tai sumutuskuivauksella.

Fenyylialaniinin poistumisaste proteiinikoostumuksesta on n. 92 - 100 %. Täten menetelmällä voidaan valmistaa PKU-proteiinia, jonka fenyylialaniinipitoisuus on alhaisempi kuin aiemmin käytetyissä proteiinin hydrolyysiin perustuvissa menetelmissä (fenyylialaniinin poistumisaste 90 - 95 %). Prosessin kokonaisproteiinisaanto on 45 - 65 % sen mukaan, kuinka fenyylialaniiniton tuotteesta halutaan. Tietyllä poistumisasteella saanto on joka tapauksessa parempi kuin kirjallisuudessa esitetyissä menetelmissä.

Menetelmä voidaan toteuttaa joko siten, että hartsikäsittely suoritetaan välittömästi hydrolysointivaiheen jälkeen tai siten, että hartsikäsittely suoritetaan myöhemmin.

Keksinnön mukaisen menetelmän edullisuutta lisää se, että käytetty adsorptiohartsi voidaan regeneroida 4 % lipeällä, minkä jälkeen hartsia voidaan käyttää uudelleen.

5 Keksinnön mukaisella menetelmällä saadun oleellisesti fenyylialaniinittömän proteiinituotteen aminohappoprofiili on välttämättömien aminohappojen osalta hyvä (taulukko 1). Ainoastaan tyrosiinin ja metioniinin lisäykset ovat välttämättömiä. Tuote sisältää runsaasti ravitsemuksellisesti arvokkaita di- ja tripeptidejä sekä n. 25 %
10 vapaita aminohappoja. Tuotteen maku on markkinoilla oleviin tuotteisiin verrattuna erinomainen. Lisäksi jauhe liukenee hyvin lämpimään veteen.

 Keksinnön mukaisesti saatua proteiinipitoista koostumusta, josta fenyylialaniini on poistettu joko kokonaan tai ainakin suurelta osin, voidaan käyttää erikoisravintovalmisteenä tai erikoisravintovalmisteen valmistuksessa.

 Seuraavissa esimerkeissä kuvataan keksintöä yksityiskohtaisemmin.

20 Esimerkki 1

 Liuotettiin 100 kg 35 - 90 paino-% proteiinia sisältävää heraproteiinikonsentraattia (Kuivamaito Oy, Lapinlahti) 1900 litraan lämmintä vettä (5 % liuos kuiva-
25 aineen suhteen). Kuumennettiin jatkuvasti sekoittaen 20 min 65 °C kontaminaatioiden eliminoimiseksi. Jäähdytettiin 50 °C:een ja pH säädettiin 8,5:een 5 M $\text{Ca}(\text{OH})_2$:lla. Lisättiin 3 paino-% pankreatiinia proteiinin määrästä laskettuna ja hydrolysoitiin 6 tuntia. pH:n annettiin laskea
30 7,0:ään, missä se pidettiin 5 M $\text{Ca}(\text{OH})_2$:lla. Hydrolyysin jälkeen liuos pastöroitiin (95 °C, 5 min), jäähdytettiin ja ultrasuodatettiin 40 °C:ssa cut-off 20 000 -kalvoilla. Permeaatti otettiin talteen ja konsentroitiin haihduttamalla n. 50 % kuiva-ainepitoisuuteen.

 Konsentroidu proteiinihydrolysaatti kuivattiin jauheeksi sumutuskuivaamalla.
35

Esimerkki 2

Toimittiin kuten esimerkissä 1, mutta kuivaamisen sijasta 50 % kuiva-ainepitoisuuteen konsentroitua permeaattia säilöttiin 5 °C:ssa jatkotoimenpiteitä varten.

5 Prosessin kokonaissaanto oli parempi kuin esimerkissä 1 koska välttyttiin hydrolysaatin sumutuskuivaukseen liittyvältä hävikiltä.

Esimerkki 3

10 Liuotettiin 12,5 g esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 37,5 cm³:iin 80 - 90 °C vettä. Saadun proteiinihydrolysaattiliuoksen pH oli n. 6,5 - 7,0, jolloin pH-säätöä ei tässä vaiheessa tarvittu lainkaan. Liuos, joka sisälsi 25 paino-% kuiva-ainetta, josta noin 70 % oli proteiinia, pumpattiin 30 °C:ssa 180 cm³ XAD-4 -
15 adsorptiohartsipylvääseen tilavuusvirtausnopeudella 60 cm³/h, mikä vastasi lineaarivirtausnopeutta 0,3 m/h. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

20 Proteiinisaanto oli n. 50 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,5 %.

Esimerkki 4

25 Liuotettiin 7,5 g esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 30 cm³:iin 80 - 90 °C vettä. 20 % liuos (pH 6,5 - 7,0) pumpattiin 180 cm³ XAD-16 -adsorptiohartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 0,9 m/h lämpötilassa 30 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

30 Proteiinisaanto oli n. 50 % ja kuiva-ainesaanto n. 55 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,4 %.

Esimerkki 5

35 Toimittiin muuten samoin kuin esimerkissä 4, mutta lämpötila oli 65 °C. Lämpötilan nostaminen paransi hartsipylvään mikrobiologista säilyvyyttä, mutta lisäsi energia-

kustannuksia sekä pienensi mahdollisesti hartsin elinikää. Tuotteen laatu ja saanto pysyivät ennallaan.

Esimerkki 6

5 Toimittiin muuten samoin kuin esimerkissä 4, mutta lämpötila oli 5 °C. Lämpötilan alentaminen paransi hartsi-
pylvään mikrobiologista säilyvyyttä, mutta lisäsi energia-
kustannuksia. Tuotteen laatu ja saanto pysyivät ennallaan.

Esimerkki 7

10 Liuotettiin 2,1 kg esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 10,5 litraan 80 - 90 °C vettä.
20 % liuos (pH 6,5 - 7,0) pumpattiin 50 l XAD-16 -adsorp-
tiohartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 1,3 m/h läm-
pötilassa 55 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syö-
tön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausno-
15 peudella.

Proteiinisaannolla 50 % fenyylialaniinia oli proteiinin määrästä n. 0,3 %, saannolla 45 % saatiin jae, joka ei sisältänyt lainkaan fenyylialaniinia. Tiedot tuoteja-
keen (50 % proteiinisaannolla) koostumuksesta on esitetty
20 taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1: Esimerkin 7 mukaan tehdyn, sumutus-
kuivatun PKU-proteiinihydrolysaatin aminohappokoos-
tumus

5	<u>Aminohappo</u>	<u>mg/g</u>	<u>%</u>
	Asp	88,4	12,6
	Thr	49,41	7,0
	Ser	37,87	5,4
	Glu	156,38	22,3
10	Gly	11,01	1,6
	Ala	36,64	5,2
	Val	45,7	6,5
	Cys	12,07	1,7
	Met	12,63	1,8
15	Ile	31	4,4
	Leu	57,95	8,3
	Tyr	20,65	2,9
	Phe	2,37	0,3
	Lys	90,96	13,0
20	His	12,92	1,8
	Arg	18,36	2,6
	Pro	16,87	2,4
	Trp	+	+
25	Yhteensä	701,19	100

Taulukko 2: Esimerkin 7 mukaan tehdyn, sumutus-
kuivatun PKU-proteiinihydrolysaatin koostumus

5	Proteiini	66,0 %
	Tuhka	6,0 %
	Vesi	4,4 %
	Laktoosi	12,1 %

10	Natrium	12,7 g/kg proteiinia
	Kalium	26,1 g/kg proteiinia
	Kalsium	5,8 g/kg proteiinia
	Kloridi	6,1 g/kg proteiinia
	Fosfori	3,2 g/kg proteiinia

15 Esimerkki 8

20 Mitattiin 4,2 kg esimerkin 2 mukaisesti tehtyä proteiinihydrolysaattikonsentraattia 6,3 kg:aan vettä. Saatu liuos, jonka kuiva-ainepitoisuus oli 20 paino-% ja pH 6,7, pumpattiin 50 l XAD-16 -adsorptiohartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 1,3 m/h lämpötilassa 55 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä elu-
oitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

25 Proteiinisaanto oli n. 50 % ja kuiva-ainesaanto n. 55 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,3 %.

Esimerkki 9

30 Liuotettiin 22 g esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 88 cm³:iin 80 - 90 °C vettä. Liuoksen pH säädettiin 30 % HCl:llä pH 3,5:een ja liuos pumpattiin 180 cm³ XAD-16 -adsorptiohartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 0,9 m/h lämpötilassa 65 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä elu-
oitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

35 Proteiinisaanto oli n. 52 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,1 %.

Ylimääräisen kloridin poistamiseksi tuotelios elektrodialysoitiin, minkä jälkeen se kuivattiin sumutuskuivauksella.

Esimerkki 10

5 Toimittiin vastaavasti kuin esimerkissä 4, paitsi että liuoksen pH nostettiin 10,0:een 10 % NaOH:lla ennen hartsikäsittelyä. Voimakkaasti emäksisenä liuos ei tarvinnut voimakasta kuumennuskäsittelyä kirkastuakseen.

10 Proteiinisaanto oli n. 45 %. Tuoteliosuksessa fenyyli-alaniinia oli proteiinista 0,4 %.

Ylimääräinen natrium poistettiin liuoksesta elektrodialyysillä, minkä jälkeen liuos kuivattiin kylmäkuivauksella.

Esimerkki 11

15 Liuotettiin 104 g soijaproteiinijauhoa (52 % proteiinipitoisuus) 1400 cm³:iin vettä. Kuumennettiin 65 °C:ssä 20 min, minkä jälkeen jäähdytettiin 50 °C:een. pH säädettiin 5 M Ca(OH)₂:lla 8,5:een. Lisättiin 1,62 g pankreatiinia (3 % proteiinin määrästä). pH:n annettiin laskea 7,0-
20 :aan, minkä jälkeen hydrolysoitiin pH 7,0:ssa 5 h. pH säädettiin hydrolyysin aikana 5 M Ca(OH)₂:lla. Hydrolysaatti ultrasuodatettiin cut-off 10 000 -kalvolla, permeaatti otettiin talteen ja konsentroitiin kuiva-aineeltaan 20 %:iseksi.

Esimerkki 12

25 Mitattiin 38 cm³ esimerkin 11 mukaisesti tehtyä proteiinihydrolysaattia. Liuoksen pH säädettiin 30 % HCl:llä arvoon 6,8 ja liuos pumpattiin 180 cm³ XAD-16 -adsorptio-
30 hartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 0,9 m/h lämpötilassa 65 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

35 Proteiinisaanto oli n. 55 %, fenyyli-alaniinia 0,3 % proteiinista (taulukko 3). Tuote oli hyvän makuinen eikä lainkaan kitkerä.

Taulukko 3: Soijaproteiinin ja soijaproteiinista valmistetun PKU-proteiinin aminohappokoostumus (%)

		Soijaproteiini (% proteiinista)	PKU-proteiini (% proteiinista)
5	Asp	12,3	12,9
	Thr	4,2	4,3
	Ser	5,4	6,0
10	Glu	20,9	22,9
	Gly	4,5	3,7
	Ala	4,6	6,1
	Val	4,8	4,9
	Cys	1,1	0,3
15	Met	1,2	0,8
	Ile	4,7	2,5
	Leu	7,7	3,5
	Tyr	2,8	4,2
	Phe	5,0	0,3
20	Lys	6,6	10,3
	His	2,8	2,3
	Arg	6,8	11,1
	Pro	4,8	2,0
.. 25	Tot	100,0	100,0

Esimerkki 13

PK AID III:n, pankreatiinihydrolysaatin sekä hart-sikäsitellyn pankreatiinihydrolysaatin makuvertailussa testiin osallistujat (6 kpl) antoivat pisteitä 0-3 seuraavan asteikon mukaisesti:

0 = ei lainkaan kitkerä
 1 = hieman kitkerä
 2 = selvästi kitkerä
 3 = erittäin kitkerä.

Patenttihakemuksessa kuvatulla menetelmällä valmistetun PKU-proteiinin pisteiden keskiarvo oli 0,2, PK AID III:n 1,8 ja entsyymikäsitellyn proteiinin 3,0. Kaikkien osallistujien mielestä patenttihakemuksessa kuvatulla menetelmällä valmistettu PKU-proteiini oli selvästi vähiten
5 kitkerä, viiden osallistujan mielestä ei lainkaan kitkerä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi protei-
iinipitoisista koostumuksista, t u n n e t t u siitä,
5 että

a) proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä protei-
iini pilkotaan entsymaattisesti proteolyyttisellä entsyy-
millä proteiinihydrolysaatiksi, jonka hydrolysoitumisaste
on noin 30 - 60 %,

10 b) näin saatu proteiinihydrolysaatti ultrasuodate-
taan ja permeaatti otetaan talteen,

c) haluttaessa liuoksen pH:ta säädetään alueella 2
- 10 suolahapolla tai lipeällä,

15 d) näin saatu proteiinihydrolysaatti johdetaan
adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi lineaarivirtaus-
nopeudella 0,1 - 1,3 m/h, lämpötilassa 5 - 65 °C,

e) pylvästä eluoidaan vedellä lineaarivirtaus-
nopeudella 0,1 - 1,3 m/h,

20 f) otetaan talteen jae, josta fenyylialaniini on
poistettu,

g) tarvittaessa talteenotetusta jakeesta poistetaan
suoloja, ja

h) lopuksi talteenotettu jae konsentroidaan kuiva-
ainepitoisuuteen 70 - 80 paino-% ja haluttaessa kuivataan.

25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että proteiinipitoinen koostumus
on heraproteiinia tai soijaproteiinia.

30 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että proteolyyttinen entsyymi on
pankreatiini.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että pankreatiinia käytetään noin
3 paino-% proteiinin määrästä laskettuna.

35 5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen me-
netelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) tal-

teenotettu permeaatti konsentroidaan ja kuivataan edullisesti sumutuskuivauksella jauheeksi, joka ennen jatkokäsittelyä liuotetaan kuumaan veteen.

5 6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiohartsina käytetään hydrofobista polystyreenirunkoista hartsia.

10 7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi johdetaan proteiinihydrolysaattiliuosta, jonka pH on 6,5 - 7,0.

8. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hartsikäsittelylämpötila on noin 30 °C.

Patentkrav

1. Förfarande för avlägsning av fenylalanin ur proteinhaltiga sammansättningar, k ä n n e t e c k n a t
5 därav att

a) proteinet i den proteinhaltiga sammansättningen spjälks enzymatiskt med hjälp av ett proteolytiskt enzym till ett proteinhydrolysat med en hydrolyseringsgrad av ca 30 - 60 %,

10 b) det så erhållna proteinhydrolysatet ultrafiltreras och ett permeat tillvaratas,

c) lösningens pH regleras, om så önskas, inom området 2 - 10 med hjälp av saltsyra eller lut,

15 d) det så erhållna proteinhydrolysatet passeras genom en med adsorptionsharts fylld kolonn vid ett lineärt flöde av 0,1 - 1,3 m/h vid en temperatur av 5 - 65 °C,

e) kolonnen elueras med vatten vid ett lineärt flöde av 0,1 - 1,3 m/h,

20 f) en fraktion, ur vilken fenylalanin avlägsnats, tillvaratas,

g) salter avlägsnas vid behov ur den tillvaratagna fraktionen, och

25 h) den tillvaratagna fraktionen koncentreras till slut till en torrämneshalt på 70 - 80 vikt-% och torkas om så önskas.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav att den proteinhaltiga sammansättningen är vassleprotein eller sojaprotein.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav att det proteolytiska enzymet är pankreatin.

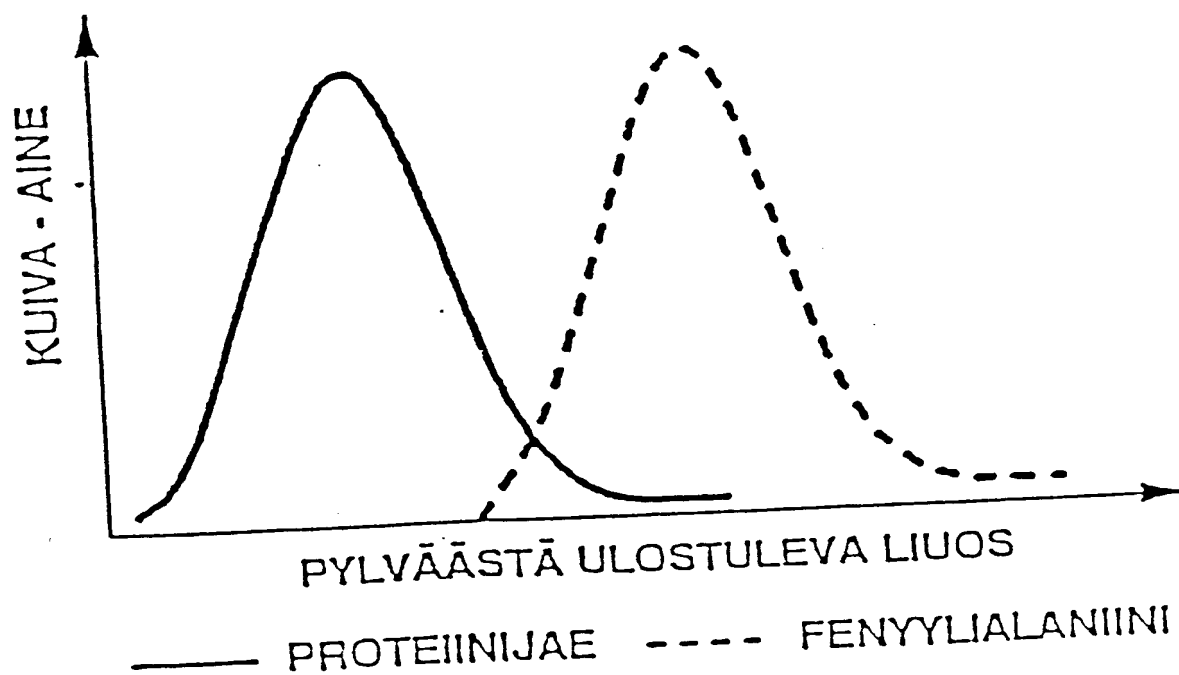
30 4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav att pankreatin används i en mängd av ca 3 vikt-% av proteinets mängd.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4,
k ä n n e t e c k n a t därav att det i steg b) tillvara-
tagna permeatet koncentreras och torkas, företrädesvis
genom spraytorkning, till ett pulver, som före fortsatt
5 behandling upplöses i hett vatten.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 5,
k ä n n e t e c k n a t därav att som adsorptionsharts
används ett hydrofobt harts med polystyrenstomme.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6,
10 k ä n n e t e c k n a t därav att genom den med adsorp-
tionsharts fyllda kolonnen passeras en proteinhydrolysats-
lösning med ett pH av 6,5 - 7,0.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 7,
15 k ä n n e t e c k n a t därav att hartsbehandlingstempe-
raturen är ca 30 °C.



Kuva 1. Proteiinijakeen erottuminen fenyylialaniinista sekä fenyylialaniinia sisältävistä peptideistä hartsipylväältä eluoituvassa liuoksessa.

02.03.99

REKISTERI

04-03-1999

KOLSTER OY AB

Kolster Oy Ab

Iso Roobertinkatu 23

00120 Helsinki

Patenttihakemus nro:

982114

Luokka:

A 23L

/ MT

Hakija:

Valio Oy

Asiamies:

Kolster Oy Ab

Asiamiehen viite:

2980445FI

Määräpäivä

02.09.99

Patenttihakemuksen numero ja luokka on mainittava kirjelmässänne FRH:lle

Patenttoinnin edellytyksenä on, että keksintö on uusi ja eroaa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta (PL 2 §). Hakemus ei ole hyväksyttävissä nykyisten patentti-vaatimusten esittämässä muodossa, koska patentti-vaatimukset eivät osittain ole uusia eivätkä toisaalta ole riittävän täsmällisiä (PL 3 § 2 mom.).

Patentti-vaatimus 1 kohdistuu menetelmään naudan insuliinin poistamiseksi lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista saattamalla materiaali kosketukseen adsorptiohartsin kanssa. Hakemuksessa on myös itsenäiset patentti-vaatimukset 10 - 12, jotka kohdistuvat menetelmällä saatun proteiinipitoiseen materiaaliin, sen käyttöön sekä menetelmään ravintovalmisteiden valmistamiseksi, joissa proteiiniosana käytetään kyseistä materiaalia.

Kuten hakemuksen selitysosassa on mainittu, tunnetaan hakijan aikaisemmasta suomalaisesta patenttihakemuksesta FI A 971872 (A23 J 1 20, hak.pv. 30.4.97, julk. 31.10.98) naudan insuliinin poistaminen lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvattomasta maidosta käyttäen kationinvaihtoa ja mahdollisesti sen jälkeen hydrolyysia ja kromatografiakäsittelyä, esim. adsorptiohartsikäsittelyä. Hakemuksesta FI 971872 on tullut tunnetuksi myös yleisesti lehmänmaidosta peräisin oleva proteiinikoostumus, joka ei oleellisesti sisällä naudan insuliinia, samoin kuin sen käyttö äidinmaidonkorvikkeen tai muun erityisravintovalmisteen proteiiniosana sekä vastaavasti tällaiset tuotteet ja niiden valmistus.

Hakemuksessanne nyt esitetty menetelmä eroaa aikaisemmassa hakemuksessa esitetystä ja on siihen nähden periaatteessa patentoitavana. Tuotteeseen ja käyttöön kohdistuvia vaatimuksia 10 - 12 ei voida hyväksyä, koska ne eivät ole uusia hakemuksesta FI 971872 ilmenevään nähden. Myös silloin, kun tuote on valmistettu menetelmän avulla, tuotteeseen tulee olla uusi. Koska aikaisemmassa hakemuksesta FI 971872 tunnetaan yleisesti vastaavanlainen proteiinikoostumus ja sen käyttö samoihin tarkoituksiin, ei käsillä olevan hakemuksen tuotteeseen ja käyttöön liittyviä vaatimuksia 10 - 12, vaikkakin ne on määritelty patentoitavissa olevan valmistusmenetelmän avulla, voida hyväksyä puuttuvan uutuuden vuoksi (PL 2 § 2 mom 4. virke).

Adsorptiohartsikäsittelyä on lisäksi mm. suomalaisten patenttihakelaisten FI C 4 089 (A23 J 3/00) ja FI C 94 088 (A23 J 3/00) mukaan käytetty aikaisemmin lehmänmaidosta peräisin olevan proteiinipitoisen materiaalin käsittelyyn. Näissä menetelmissä tosin ennen adsorptiohartsikäsittelyä suoritetaan proteiinimateriaalin entsyymaattinen hydrolysointi. Lehmänmaidosta peräisin olevan proteiinipitoisen materiaalin käsittelyä adsorptiohartsilla on kuvattu myös mm. hakemushakelausissa EP A1 284 525 (A23 J 1/20).

Insuliinin poistamismenetelmään kohdistuva itsenäinen vaatimus 1 on nykyisessä muodossaan epätasällinen (PL 9 § 2 mom.). Siinä tulisi täsmällisemmin esittää, millä tavalla haluttu vaikutus eli nautan insuliinin poistaminen saavutetaan. Hakemuksessa ei ole riittäviä perusteluja sille, että pelkästään proteiinipitoisen materiaalin saattaminen kosketukseen minkä tahansa adsorptiohartsin kanssa vaatimuksessa 1 hyvin laajasti määritellyissä olosuhteissa, saisi aikaan tarkoitetun vaikutuksen. Menetelmän täsmennykseksi ja selväksi erottamiseksi tunnetusta tekniikasta, tulee siis vaatimusta 1 täsmentää ainakin käytetyn adsorptiohartsin ja käytettävien olosuhteiden osalta. Täsmennyksissä tulee ottaa huomioon, että niiden tulee perustua hakemuksen perusasiakirjaan (PA 19 §).

Liitteet: tutkimusraportti ja viitteiden hakelausien kopiot

Marija Tamminen

Tutkijainsinööri
Puhelin: (09) 69395679

Marija Tamminen

Lausumanne huomautusten johdosta on annettava viimeistään yllämainittuna määräpäivänä. Teille on annettu lausumanne virastoon viimeistään mainittuna määräpäivänä tai ryhtynyt toimenpiteisiin tässä välipäätöksessä esitettyjen puutteellisuuden korjaamiseksi, päätetään hakemus siltä osin patenttilain 15 §. Siltä osin päätetty hakemus otetaan uudelleen käsiteltäväksi, jos Te neljän kuukauden kuluessa määräpäivästä annatte lausumanne tai ryhtyette toimenpiteisiin esitettyjen puutteellisuuden korjaamiseksi ja samassa ajassa suoritate vahvistetun maksun, 320 mk hakemuksen ottamisesta uudelleen käsiteltäväksi. Jos lausumanne on annettu virastoon oikeassa ajassa, mutta esitettyjä puutteellisuuden ei ole siten korjattu, että hakemus voitaisiin hyväksyä, se hylätään, mikäli virastolla ei ole aihetta antaa Teille uutta välipäätöstä patenttilain 15 §. Uusi keksinnön selitys, siihen tehdyt lisäykset ja uudet patenttivaatimukset on aina jätettävä kahtena kappaleena ja tällöin on otettava huomioon patenttiasetuksen 19 §.



PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
982114	A23 J 1/20, 3/08, A23 C 9/14

TUTKITTU AINEISTO

Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US), tutkitut luokat

A23 J 1/20, 3/00, 3/08, A23 C 9/14 - 9/148

Tiedonhakuja

Patenttitietokannoista: EPODOC (Euroopan patenttioviraston julkaisukokoelma, 1970-), WPI (World Patents Index, Derwent, 1974-), PAJ (Patent Abstracts of Japan, 1975-)

Muista tietokannoista: FSTA (Food Science and Technol. Abstracts, 1969-), CAPLUS (Chemical Abstracts, 1969-), MEDLINE (1966-), BIOSIS (1969-)

VIITEJULKAISUT

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
X	FI A 971872 (A23 J 1/20, julk. 31.10.98, PL 2 § 2 mom 4. virke)	10 - 12
A	FI C 94 089 (A23 J 3/00)	1 - 9
A	FI C 94 088 (A23 J 3/00)	1 - 9
A	EP A1 284 525 (A23 J 1/20)	1 - 9

- *) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna
Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä
ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este

Päiväys 23.1.99	Tutkija Marja Tamminen
--------------------	---------------------------

